

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd

Fragmentace DNA spermií u poruch mužské reprodukce
DNA Fragmentation Sperm in Male Reproductive Failure

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce Doc.RNDr.Vladimír Semecký, CSc.

Doc. MUDr. Milan Macek, CSc

Hradec Králové 2009

Jana Ichová

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

V Praze 11.8.2009

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. V. Semeckému, CSc. a Doc. MUDr. M. Mackovi sr, CSc. za vedení při řešení mé bakalářské práce. Také děkuji RNDr. B. Novotné, CSc., jako praktickému školiteli, při vypracovávání mé experimentální práce, za pomoc a čas, který mi věnovala. Dále velmi děkuji MUDr. P. Houskovi za odborné vedení, za jeho kritické úvahy a pomoc při vyhledávání literatury a jejího překladu. A také děkuji celému kolektivu z Centra reprodukční genetiky Fakultní nemocnice v Motole za velkou trpělivost.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá aplikací metody Comet Assay za účelem vyšetření fragility lidské DNA u spermií. V literární rešerši jsou uvedeny příčiny mužské neplodnosti a fragility DNA, dále jsou zmiňovány metody základního vyšetření spermatu, které předcházejí vyšetření fragility DNA. Následuje přehled metod vyšetření fragility DNA spolu s detailním popisem metody Comet Assay.

V praktické části jsme se nejprve seznámili s již zavedenou metodou na AVČR, kde pomocí Comet Assay vyšetřují fragilitu DNA na leukocytech. Tento postup není použitelný na spermie, protože spermie má více zabalenou DNA. Vyhledali jsme proto v odborné literatuře vyzkoušené postupy, kdy byla fragilita DNA spermií pomocí metody Comet Assay již stanovována. Jednalo se o postupy dle Schmid a Lewisové. Kombinací ověřeného postupu na AVČR a těchto metod jsme se snažili převést a modifikovat vyšetření Comet Assay tak, aby bylo použitelné k vyšetření fragility DNA na spermiích.

Při vzájemném srovnání uvedených metod jsme zjistili, že obě metody poskytují téměř totožné výsledky a DNA se úspěšně rozvolňuje. Pro naše další pokusy jsme vybrali metodu podle Schmid, neboť použitý postup je kratší. V současné době tuto metodu stále upravujeme a postupně optimalizujeme jednotlivé kroky při přípravě DNA spermií k analýze Comet Assay.

Abstract

This thesis deals with the application of the Comet Assay for sperm DNA fragility diagnostics. In the part of literature research the causes of paternal infertility and DNA fragility are listed. Further on the methods of basic sperm diagnostics which precede the DNA fragility diagnostics are explained. As last, the list of the methods for testing DNA fragility is given, together with detailed description of the Comet Assay.

In the practical part, we got familiar with this method at CAS (Czech Academy of Sciences) where DNA fragility of leucocytes is examined. This analytical process is not applicable for sperm cells, because their DNA is more compacted. We have searched in the literature for projects, which have already dealt with the sperm DNA fragility. We found work of Schmid and Lewis. Putting together the verified method and methods by Schmid and Lewis we tried to modify the Comet Assay in a way to use it for sperm DNA fragility diagnostics.

After comparing both methods we found out, that they both give almost similar results and that DNA unwinds successfully. For our further experiments we chose the method of Schmid, because the procedure is shorter. Currently we are further modifying and optimizing each step leading to sperm DNA preparation for Comet Assay analysis.

Obsah

1	Úvod	6
1.1	Příčiny mužské neplodnosti	6
1.2	Příčiny fragility DNA	7
1.2.1	Deficit v rekombinaci	8
1.2.2	Abnormální zrání spermatid	8
1.2.3	Neschopnost vstoupit do apoptózy	8
1.2.4	Oxidativní stres	8
2	Metody vyšetření	9
2.1	Vyšetření spermiogramu	9
2.1.1	Základní vyšetření	9
2.1.2	Rozšířené vyšetření	10
2.1.3	FISH vyšetření	10
2.2	Přehled metod na vyšetření fragility	11
2.2.1	SCSA	11
2.2.2	TUNEL	11
2.2.3	Comet Assay	12
2.2.4	AOT	12
2.2.5	ISNT	13
2.2.6	DBD-FISH	13
2.2.7	SCDA	13
2.2.8	Filter elution	14
2.2.9	K-SDS precipitace	14
2.2.10	UDS assay	14
2.2.11	Další metody	15
2.3	Comet Assay	15
2.3.1	Charakteristika Comet Assay	15
2.3.2	Základní postupy	17
2.3.3	Alternativní postupy	19
2.3.4	Modifikace na spermie	20
3	Praktická část	22
3.1	Spermiogram	22
3.1.1	Pracovní postup	22
3.2	Modifikace Comet Assay pro použití na spermie	24
3.2.1	První experimenty	24
3.2.2	Modifikace pro spermie	24
3.2.3	Zkoumání vlivu modifikací	25
3.2.4	Hledání postupu pro pipetaci	27
3.2.5	Pokusy o přípravu médií na CRG	28
3.2.6	Zavedení Comet Assay na CRG	28
3.2.7	Optimalizování	29
3.2.8	Standardizace	29
3.3	Software	30
4	Závěr	32
4.1	Současný stav	32
4.2	Další plány	32
4.3	Přínosy zavedení Comet Assay	32
5	Literatura	33

1 Úvod

Analýza spermií je základní pilíř klinického vyšetření neplodných mužů. Objem semene a jeho pH jsou ukazatelem funkce semenného vaku a prostaty. Koncentrace spermií, jejich motilita a morfologie jsou obrovskou měrou ovlivňovány funkcí varlat a v neposlední řadě také post-varlatární funkcí genitálního traktu. Přestože mají plodní muži vyšší průměrné parametry spermií (koncentrace, motilita a morfologie) než neplodní muži, dochází v těchto parametrech u obou skupin mužů ke značnému prolínání. (Evenson, 1999) Navíc jsou tyto parametry většinou nedostatečnými ukazateli reprodukčních výsledků.

K rozlišení neplodných a plodných mužů je potřeba vytvořit nové markery, pomocí kterých bude možné předpovědět úspěch či neúspěch při oplodnění. V současné době se začínají jevit měřené konvenční parametry semene jako nedostatečné. Postupně se začíná upínat pozornost na markery integrity DNA spermií, které mohou být lepším měřítkem mužské plodnosti než konvenční metody, ale pořád nebyly provedeny rozsáhlé studie, které by definovaly klinickou hodnotu testované integrity DNA spermií. (Evenson, 1999; Spano, 2000; Zini, 2001; Guzick, 2001) S rozvojem nových technologií asistované reprodukce je již technicky možné studovat míru poškození DNA spermií.

Fertilizace v sobě zahrnuje přímou interakci spermie a vajíčka, splynutí buněčných membrán a spojení mužských a ženských gametických jader. (Ahmadi, 1999) V současné době to vypadá, že existuje určitá hranice poškození DNA spermií (jako například fragmentace DNA, nedostatek protaminu) za kterou nedochází k vývoji embrya a otěhotnění. (Ahmadi, 1999; Cho, 2003) Současné klinické studie ukazují, že poškození DNA spermií u lidí může za nepříznivé efekty na výsledcích reprodukce a zároveň ukazují, že spermatozoon neplodných mužů vykazuje značně větší množství poškozené DNA než spermatozoon plodných mužů (Evenson, 1999; Spano, 2000; Zini, 2001; Kodaky, 1997).

V současné době trvale přibývá počet neplodných párů, a proto dochází ve světě k dynamickému rozvoji technik k vyšetřování a léčbě neplodnosti. I na našem pracovišti se snažíme zkvalitnit péči o naše pacienty a tak hledáme stále novější a efektivnější léčebné postupy.

Ve své bakalářské práci uvádím zavádění metody Comet Assay k vyšetření fragmentace DNA u mužských pohlavních buněk.

1.1 Příčiny mužské neplodnosti

Mužská neplodnost je často ve vztahu ke sníženému počtu, motilitě a morfologii spermií. Při prvním vyšetření muže s podezřením na poruchu reprodukce, tzv. spermioqramu,

nacházíme anomálie ve spermatu, a to azoospermie, oligozoospermie, asthenozoospermie, teratospermie a oligoasthenoteratozoospermie. Při azoospermii v ejakulátu nejsou přítomny žádné spermie. Oligozoospermii se vyznačuje koncentrací spermií menší než 20 mil/ml. Asthenozoospermie je charakteristická menším než 50 % počtem spermií pohybujících se dopředu nebo méně než 25 % spermií pohybujících se rychle dopředu. Při teratozoospermii je přítomno méně než 21 % spermií s normální morfologií a u oligoasthenoteratozoospermii nalézáme kombinaci odchylek koncentrace, motility a morfologie spermií (WHO, 1999).

Další možnou příčinou neplodnosti u muže může být chromozomální aberace. Nejčastější chromozomální porucha spojená s mužskou infertilitou je Klinefelterův syndrom (47, XXY). Tento syndrom se vyskytuje u 11% sterilních mužů s azoospermii a u 0,7% mužů s oligozoospermii (Bielanska et al, 2000).

Jednou z dalších příčin mužské infertility jsou mikrodelece chromozomu Y v oblasti Yq11.23 zvané faktor azoospermie (AZF). Tyto delece jsou asociovány s azoospermii nebo těžkou oligozoospermii. Histopatologický nálezn na testes v těchto případech je v širokém spektru od úplné absence zárodečných buněk přes zástavu jejich zrání po sníženou tvorbu spermií.

Mezi další možné příčiny infertility lze zařadit azoospermii podmíněnou obstrukcí vývodných semenných cest. V 6 – 10 % nacházíme tzv. kongenitální bilaterální absenci vas deferens u pacientů s cystickou fibrózou (Macek, 2002).

Další patologický stav, který může podmínit neplodnost je varikokéla – rozšíření žilní pleteně plexus pampiniformis ve varleti, což vede k poruše mikrocirkulace a nadměrnému zahřívání varlete, hormonálním změnám a tím k poškození spermatogeneze. Varikokéla může být jednostranná i oboustranná. Rozšířené žíly lze operativně odstranit.

Snížení plodnosti dále vykazují pacienti s nesestouplými varlaty (kryptorchismus), kdy během posledních dvou měsíců fetálního vývoje nesestoupí varlata inguinálním kanálem do skrota. Následkem toho dochází ke stejné příčině poruchy tvorby a dozrávání spermií jako u varikokély.

1.2 Příčiny fragility DNA

Fragmentace DNA je charakterizována přerušením jednoho nebo obou vláken DNA a velice často se vyskytuje v ejakulátu subfertilních mužů (Irvine, 2000). Oocyty a embrya v raném stádiu mají schopnost opravovat poruchy DNA (Matsuda, 1988; Genesca, 1992). Celkový stav poškození DNA u spermií závisí na kombinovaném efektu poškození chromatinu a kapacitě oocyty, který je schopen poškození opravovat.

Abnormální struktura chromatinu spermií může mít tyto potenciální zdroje původu:

- deficit v rekombinaci během spermiogeneze, který většinou vede k zakrnění buňky
- abnormální zrání spermatid
- neschopnost vstoupit do apoptózy
- oxidativní stres

1.2.1 Deficit v rekombinaci

Meiotické překřížení je spojováno s geneticky naprogramovaným rozpadem dvojité šroubovice DNA pomocí specifických nukleáz SPO11 (Bannister, 2004). Za normálních okolností neumožní rekombinační kontrolní bod meiotické profáze 1. meiotické dělení dokud není DNA plně opravena nebo nejsou odstraněny spermatocyty s defektem (Bannister, 2004; Page, 1997). Porušený rekombinační kontrolní bod může vést k trvalým fragmentacím jader spermií.

1.2.2 Abnormální zrání spermatid

Lidská DNA ve spermiích je obohacena o některé segmenty, které jsou částečně denaturovány a které mohou být také nazývány místy citlivými na alkalitu (Muriel, 2004). Tato místa představují potencionální přerušování DNA pokud jsou vystavena některým vnějším vlivům. I když jsou tato místa dobře chráněna správným balením chromatinu, mohou způsobit větší výskyt spontánního porušení DNA ve spermiích.

1.2.3 Neschopnost vstoupit do apoptózy

Apoptóza zárodečných testikulárních buňek se normálně objevuje během celého života. První apoptotická cesta je iniciována ve spermatogoniích a spermatocytech pomocí receptoru Fas. Tento membránový protein patří do rodiny nádorové nekrózy (Suda, 1993; Krammer, 1994). U spermií mužů s abnormálními parametry základního spermioqramu se ve větší míře vyskytuje receptor Fas na membráně.

1.2.4 Oxidativní stres

Reaktivní kyslík hraje důležitou fyziologickou roli v modulaci genů a proteinových aktivit při proliferaci, diferenciaci a fyziologických funkcích spermií. V semeni plodných mužů je množství reaktivního kyslíku regulováno dostatečným množstvím antioxidantů. Patogenetické příznaky se objevují, pokud dochází k nadbytečné produkci reaktivního kyslíku a antioxidanty nejsou schopny toto množství v mužském reprodukčním traktu nebo seminální plazmě regulovat.

2 Metody vyšetření

Pro každé specializované vyšetření, tedy i pro Kometový test, je jedním z nejdůležitějších kroků příprava biologického materiálu. U spermií se jedná zejména o vyšetření spermioqramu jak v jeho základní, tak i rozšířené formě. Pro úplnost jsou uvedeny i další specializované metody, které s kometovým testem přímo souvisejí a alternativní vyšetření na fragilitu DNA.

2.1 Vyšetření spermioqramu

Základní a rozšířené vyšetření spermioqramu poskytne nepostradatelné informace o kvalitě spermií konkrétního pacienta a může dále sloužit jako rozhodovací kritérium k použití dalších náročnějších vyšetření. K základnímu vyšetření patří vyšetření koncentrace, motility v nativním vzorku a po úpravě (swim up, hustotním gradientem apod.) a vitality (ESHRE, 2002). K rozšířenému vyšetření se řadí vyšetření na morfologii a protilátky, v naší laboratoři se provádí ještě vyšetření pomocí CASA (Computer Aided Sperm Analysis).

K vyšetření spermioqramu je potřeba čerstvý nativní vzorek spermií. Každá laboratoř má pro tyto účely zřízenou speciální místnost, alternativně může pacient přinést vzorek z domova. Vzorek se před vyšetřením nechá zkapalnět 15 – 30 min v termostatu při 37°C.

2.1.1 Základní vyšetření

V naší laboratoři se jako první provádí vyšetření motility nativního vzorku a dále jeho příprava na centrifugaci v hustotním gradientu. Tato úprava zajistí pročištění vzorku od různých příměsí, mrtvých a poškozených spermií. V průběhu přípravy jsou dále vyšetřeny tyto parametry: pH, objem, barva, viskozita a zápach. Dle WHO lze jako normální považovat spermioqram o objemu alespoň 2 ml, koncentraci alespoň 20×10^6 , s alespoň 1/2 spermií pohybujících se dopředu a pH v rozmezí 7,2 až 8,0 (WHO).

Vyšetření motility již zároveň poskytuje orientační informaci o koncentraci spermií. Přesto je doporučováno vyšetřit koncentraci po fixaci ve WHO pufru (základem je formol), a to pomocí vylepšeného Neubauerova hemocytometru.

Pro odlišení vitálních a non-vitálních spermií se předpokládá, že vitální spermie mají neporušenou buněčnou membránu (ESHRE, 2002). Jednou z metod stanovení vitality spermií je barvení eosinem, který prochází poškozenou buněčnou membránou. Po spočtení obarvených spermií je dopočítán procentuální podíl vitálních spermií.

2.1.2 Rozšířené vyšetření

K dalším vyšetřením prováděným rutinně téměř v každé andrologické laboratoři patří vyšetření morfologie jednotlivých spermií. Po očištění nativního vzorku např. v PBS (Phosphate Buffered Saline) lze vyrobit nátěr na alkoholem očištěné podložní sklíčko. To je dále nutno obarvit buď tzv. QuickDipem™ nebo Papanicolaouovým barvením. Defekty hlavičky mohou indikovat poruchu tvaru DNA ve spermiích, defekty krčku a bičíku zase ovlivňují pohyblivost spermií.

Dle Krugerových (Kruger, 1998), nebo také striktních kritérií, lze spermiie rozdělit na morfologicky normální a defektní. Morfologický nátěr lze považovat za normální, pokud se v něm nachází více než 14% morfologicky normálních spermií. Rozmezí 5-14% je považováno za hraniční nález, s méně než 5% lze usuzovat na riziko snížené plodnosti.

V naší laboratoři provádíme rovněž vyšetření pomocí CASA, umožňující přesně měřit rychlosti jednotlivých spermií. Zatím se však nejedná o WHO doporučovanou metodu, proto se její využití nerozšířilo do více laboratoří.

Posledním rutinním vyšetřením prováděným u každého pacienta je vyšetření protilátek. Při styku spermií s imunitním systémem (např. při vasektomii) dochází k produkci antigenu na povrchu spermií. Podle vlastností a umístění antigenů a koncentrace protilátek může dojít k různým kombinacím efektů: aglutinaci, cytotoxické reakci nebo bránění v průchodu (ESHRE, 2002). Nejčastěji se vyšetřují protilátky IgG a IgA pomocí přímého SpermMAR™ testu s latexem značenými protilátkami. Nález se hodnotí jako patologický, pokud se protilátky navážou u více než 50% spermií.

2.1.3 FISH vyšetření

Metoda FISH (Fluorescenční In Situ Hybridizace) umožňuje detekci jednotlivých chromozomů i specifických sekvencí (např. subtelomerických) ve vzorku. Využívá reasociace studované denaturované DNA se specifickou jednořetězcovou sondou pro příslušný chromozom či lokus. V naší laboratoři používáme FISH vyšetření na objasnění neplodnosti z důvodu aneuploidie chromozomů ve spermiích. Nejčastěji používané sondy jsou pro chromozom X, Y a 18.. Podle WHO manuálu nejsou udána kritéria pro provedení tohoto vyšetření.

Kromě toho se dá metoda FISH s úspěchem kombinovat s CA (Comet Assay), následně poskytne informaci o tom, který chromozom či jeho úsek je u konkrétního pacienta poškozen zlomy.

2.2 Přehled metod na vyšetření fragility

V poslední době se objevuje v centru zájmu odborníků na mužskou neplodnost vyšetření fragility DNA ve spermiích. Postupem času vzniklo několik metod, které byly dále upravovány a zlepšovány. Jsou hledány korelační vztahy nejen mezi jednotlivými metodami, ale i mezi úspěšností IVF programů, jiných postupů používaných při přípravě spermií a prenatální/preimplantační diagnostikou vůbec.

2.2.1 SCSA

Metoda SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) se vyvinula z AOT (Acridin Orange Test) viz dále, měří citlivost spermatické DNA na teplem nebo kyselinou indukovanou DNA denaturaci in situ, následovanou barvením pomocí akridin oranží (Evenson, 1999). Detekce se provádí průtokovou cytometrií umožňující změřit velká množství spermií ve vzorku. Užitá metachromatická barva akridin oranž fluoreskuje červeně, pokud je navázána na denaturovanou DNA a zeleně, pokud je navázána na normální dvoušroubovici DNA. SCSA měří několik parametrů. DNA fragmentation index (DFI) reprezentuje frakci spermií s detegovatelnou denaturovatelnou jednovláknovou DNA způsobenou především zlomy DNA. Highly DNA stainable cells (HDS) popisuje frakci spermií se zvýšenou přístupností DNA dvojšroubovice pro metachromatická barviva, většinou z důvodu záměny histonů za protaminy (Tarozzi et al, 2007).

Výhodou SCSA je její jednoduchost a rychlost. Také poskytuje stabilnější a srovnatelnější výsledky, obzvláště pro epidemiologické studie (Shamsi, 2008).

K nevýhodám patří chybějící informace o rozsahu poškození v jednotlivých buňkách a cena přístroje (Erenpreiss et al, 2006).

2.2.2 TUNEL

Metoda TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-Nick-End- Labelling) je široce používanou metodou díky své schopnosti přímého hodnocení fragmentace spermatické DNA. Tato technika je založena na adici značených nukleotidů na 3'-OH konec zlomů v DNA pomocí enzymaticky katalyzované reakce. Jako enzym se používá terminální deoxynukleotid transferáza. Podíl spermií s poškozenou DNA se měří buď pomocí mikroskopu nebo průtokové cytometrie (Tarozzi et al, 2007).

TUNEL je sofistikovaná, drahá a časově náročná metoda. K jejím výhodám patří schopnost měřit jednoduché i dvouvláknové zlomy zároveň (Shamsi et al, 2008).

Hlavní nevýhodou této metody je její cena, obzvláště při použití průtokové cytometrie.

2.2.3 Comet Assay

Kometový test, zvaný též SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis), je metodou využívanou již dlouho v různých epidemiologických studiích. Jedná se vlastně o zdokonalený Halo test (SCDA) viz dále, ke kterému je přidána elektroforéza na tenké vrstvě. CA se používá ke zhodnocení poškození a oprav DNA způsobených různými faktory u téměř všech typů buněk. V současné době se běžně používá ve studiích sledujících efekt UV radiace, karcinogenů, toxických látek, radioterapie a regrese nádorů (Tarozi et al, 2007).

Při CA jsou buňky umístěny do agarózového gelu a ošetřeny zničením plazmy, buněčných membrán a proteinů. Poté jsou umístěny do elektrického pole, které způsobí migraci poškozené DNA v agaróze. Buňky s fragmentovanou DNA jsou následně označeny DNA specifickými barvivými a jeví se jako komety, jejichž délka ocasu a intenzita signálu v ocase odpovídá míře poškození DNA fragmentací. U nefragmentované DNA nedochází k migraci z jádra.

Parametry komety (např. intenzita, délka a moment ocasu) jsou potom analyzovány pomocí specializovaného programu. CA může být prováděna v neutrálním nebo zásaditém prostředí. V neutrálním prostředí jsou detekovány pouze dvouvláknové zlomy, zatímco v alkalickém prostředí lze identifikovat jedno i dvouvláknové zlomy a tzv. alkalilabilní místa. Tato technika měří rovněž celkové poškození DNA v jednotlivých buňkách (Tarozi et al, 2007).

CA reprezentuje levnou a jednu z nejvíce senzitivních technik, dostupných pro měření poškození DNA. Jednou z nevýhod je nepřítomnost standardizovaných postupů, způsobující obtíže při srovnávání výsledků různých autorů.

Nevýhody CA: Poškození DNA může být nadhodnoceno díky výskytu reziduální RNA, tvořící pozadí, nebo naopak podhodnoceno kvůli výskytu proteinů, které brání pohybu fragmentů během elektroforézy. K podhodnocení může také dojít díky nedokonalé dekonenzaci chromatinu, zapletení či překrývání fragmentů nebo úplné ztrátě fragmentů. Díky velké mezilaboratorní variabilitě se CA stále nedá použít pro klinické využití (Shamsi, 2008). Pro získání spolehlivých výsledků je potřeba zkušeného pozorovatele, metoda je rovněž velmi pracná. Alkalická verze teoreticky nadhodnocuje o alkalilabilní místa.

Výhody: Pro získání výsledků stačí poměrně malé množství buněk, navíc lze data sbírat na úrovni jednotlivých buněk. Jedná se o senzitivní, jednoduchou a levnou metodu.

2.2.4 AOT

AOT (Acridine Orange Test) je původní metodou pro SCSA. Nevyžaduje drahou průtokovou cytometrii, spoléhá se na vizuální interpretaci fluorescence spermií v mikroskopu.

Vzorky předem ošetřené kyselinou citronovou (pH 2) jsou barveny akridin oranží, omyty a zakryty krycím sklíčkem. Spermie s dvouvláknovou DNA fluoreskují zeleně, zatímco s jednovláknovou DNA fluoreskují červeně.

Nevýhody: Nejasná barva, rychle mizející fluorescence a heterogenní barvení podložních sklů zdůrazňují problémy s interpretací. AOT má nižší senzitivitu detegovat ocasy komet a jeho užití k hodnocení mužské neplodnosti zůstává kontroverzní (Shamsi, 2008).

Výhody: Levné, rychlé, jednoduché rozšíření jiné metody. Jedná se ovšem o velmi subjektivní metodu.

2.2.5 ISNT

ISNT (In Situ Nick Translation) je modifikovaná forma TUNELu, která využívá inkorporaci biotinylovaného dUTP na jednovláknovém DNA v reakci katalyzované templát dependentním enzymem, DNA polymerázou 1, na rozdíl od TUNELu, který využívá na templátu nezávislý enzym. Kromě toho může být ISNT použito pouze pro jednovláknové zlomy.

Nevýhody: Nedostatečná senzitivita v porovnání s ostatními testy. Dále chybí korelace s plodností v in vivo studiích (Shamsi, 2008).

Výhody: Velmi jednoduchá metoda.

2.2.6 DBD-FISH

DBD-FISH (DNA Breakage Detection-FISH) je postup, který umožňuje in situ detekci a kvantifikaci specifických DNA sekvencí v každé buňce. Spermie umístěné v agarózové matrix na podložním skle jsou podrobeny alkalické denaturaci, která převádí dvouvláknové, jednovláknové zlomy a alkalilabilní místa na jednovláknové zlomy. Po deproteinaci a dehydrataci jsou mikrogely inkubovány se specifickými DNA sondami. Díky DNA zlomům se mohou sondy navázat ve větším počtu, což vede ke zvýšení intenzity signálu. Množství DNA zlomů v různých sekvencích DNA jádra se analyzuje měřením hybridizací různých sond.

Výhody: Na pracovištích kde se provádí metoda FISH ji lze velmi jednoduše a rychle zavést.

Nevýhody: Tato procedura je natolik nová, že není běžně používána ani v experimentálních protokolech (Andrabi, 2008).

2.2.7 SCDA

SCDA (Sperm Chromatin Dispersion Assay) je popisována jako jednoduchá a levná

metoda pro analýzu fragmentace DNA ve spermiích. Je založena na principu, že spermie s nefragmentovanou DNA jsou ponořeny do agarózové matrix a vystaveny lyzujícímu roztoku. Deproteinizovaná jádra vyprodukují halo dispergované DNA, které lze hodnotit fluorescenčním či světelným mikroskopem.

Výhody: Nepotřebuje kvantifikaci fluorescenční intenzity.

Nevýhody: Neposkytuje dostatek informací o rozsahu poškození, neboť se jedná o subjektivní hodnocení spermií s a bez halo (Andrabi, 2008).

2.2.8 Filter elution

Tato metoda byla poprvé popsána Kohnem (1973). Filtrová eluce je technika běžně používaná k měření zlomů řetězců DNA. Uvedená technika používá filtr k mechanickému bránění průchodu dlouhých (nezlomených) vláken DNA v průběhu eluce. Nejčastěji se tato technika používá v alkalických podmínkách ke změření jednovláknových zlomů. S modifikacemi se také dá použít k detekci alkalilabilních oblastí, DNA-proteinových krosslinků, DNA mezivláknových krosslinků, dvojvláknových DNA zlomů a oxidačního poškození.

Výhody: S modifikací dokáže stanovit zároveň jednovláknové i dvouvláknové zlomy, jednoduché, reprodukovatelné, senzitivní.

Nevýhody: Ke značení se používá radioaktivní materiál a navíc je metoda časově náročná (Sutherland et al, 1999).

2.2.9 K-SDS precipitace

Metoda K-SDS (sodium dodecyl sulfate) byla původně použita Zhitkovichem a Costou (Sutherland et al, 1999) využívá detergent a vysoké teploty k rozrušení nonkovalentní vazby mezi DNA a proteiny. Kovalentní vazby DNA a proteinů (DNA-protein krosslink) jsou selektivně precipitovány přidáním KCL.

Výhody: Vysoce specifické, obzvláště při použití modifikace s radioaktivitou.

Nevýhody: Použitelné pouze pro DNA-protein krosslinky (Sutherland et al, 1999).

2.2.10 UDS assay

Metoda UDS (unscheduled DNA synthesis) měří poškození DNA nepřímo kvantifikací množství DNA syntézy, vyskytující se u buněk, které neprocházejí normální S-fází DNA replikace (Sutherland et al, 1999). Tento typ DNA syntézy zvaný „nerozvrhovaná DNA syntéza“ je součástí oprav DNA. Poprvé byl tento postup popsán Williamsem (1976).

Výhody: Dá se použít in vitro i ex vivo.

Nevýhody: Jedná se o nepřímý test, který užívá radioaktivitu.

2.2.11 Další metody

DNA oxidace – měření 8-hydroxydeoxyguanosinu, detekováno pomocí HPLC (High Performance Liquid Chromatography) s tandemovou mass spektrometrií. Klinicky významná, vysoce specifická a kvantitativní metoda, která je ovšem velmi drahá. Navíc může docházet k arteficiální oxidaci a je potřeba velké množství vzorku.

Toluidin/Anilin blue stain – jednoduché metody s vysokou senzitivitou a specificitou využívající světelné mikroskopie. Toluidin se váže k poškozenému denznímu chromatinu, anilin se používá k detekci lyzinových reziduí histonů (Tarozzi et al, 2007).

Proteinová separace – nepřímé stanovení složení proteinů v jádře (protaminu, histaminu). Objektivní metoda s gelovou elektroforézou, která je ovšem poměrně pracná (Zini, 2006).

Barvení chromomycinem A3 – soutěží s protaminy o asociaci s DNA. Měří se poměr protaminace ve zralé spermi. Může využít fluorescenční mikroskopie nebo průtokové cytometrie, poměrně levná, jednoduchá metoda.

2.3 Comet Assay

Metodu Comet Assay jsme se na našem pracovišti rozhodli zavádět z několika důvodů. Primárním důvodem bylo rozšíření diagnostických a výzkumných možností celého ústavu, ale výhodná je i jako kontrolní metoda při zlepšování péče o pacienty. V neposlední řadě bude možno tuto metodu využít při plánovaných genotoxických a jiných korelačních studiích.

Tato metoda byla vybrána také s ohledem na vybavení našeho pracoviště a dlouhodobě dobré vztahy s pracovištěm na AVČR.

2.3.1 Charakteristika Comet Assay

Kometový test je jednoduchá, rychlá a senzitivní technika pro kvantifikaci DNA zlomů řetězce v individuálních buňkách. Buňky jsou zachyceny v agaróze na mikroskopickém podložním skle, poté zality detergentem a vystaveny vysoké koncentrací solí k extrakci celulárních proteinů. Výsledné „nukleoidy“ obsahují hutně stočenou DNA. Jestliže byla DNA poškozena, dochází k uvolňování „supercoiled“ DNA a v průběhu elektroforézy migrují uvolněné kruhy a zlomené DNA fragmenty směrem k anodě. Neporušená DNA zůstává zadržena uvnitř nukleoidu. Fluorescenčním mikroskopem jsou pak pozorovány kometě podobné vzory DNA.

Tato technika byla poprvé uvedena Ostlingem a Johansonem (1984), kteří hodnotili DNA poškození v ozářených buňkách. Jejich práce byla prováděna za téměř neutrálního pH. Protože neutrální pH neumožňuje rozvláknění DNA, byla metoda více senzitivní k dvojláknovým než k jednovláknovým zlomům DNA. Singh et al (1988) modifikoval tuto techniku užitím alkalických podmínek při elektroforéze (pH přibližně 13). Tím bylo způsobeno rozrušení párování bází a byla umožněna separace vláken DNA (unwinding), toto uspořádání je proto více senzitivní k jednovláknovým zlomům. Výsledně je alkalický kometový test senzitivní jak k jednovláknovým, tak i dvouvláknovým zlomům DNA, zároveň i k nepřímým jednovláknovým zlomům vytvořeným na tzv. alkaliklabilních apurinických místech. Navíc mohou být rovněž detegovány zlomy vláken, které se vyskytnou v průběhu DNA excizní opravy.

Od zavedení této metody byly publikovány mnohé její modifikace. Hlavní adaptace obsahovaly použití stále více senzitivního DNA barvení, přidání odstraňovačů volných radikálů, zařazení DNA opravných enzymů, používání buněčných kultur bez možnosti oprav DNA, nebo přidání inhibitorů oprav a zlepšování kvantifikace poškození.

Kometový test má mnoho výhod oproti ostatním metodám. Data jsou sbírána pro jednotlivé buňky, tudíž je možno vyhodnotit variabilitu uvnitř populace. Oproti tomu ostatní techniky poskytují informaci pouze vzhledem k průměrnému množství zlomů DNA v buňce. Kometový test sice potřebuje viabilní buňky, ale protože není používáno žádné radioaktivní značení, není potřebný růst buněk. Díky tomu může být kometový test použit pro většinu eukaryotických buněk a je potřeba pouze několik tisíc buněk. Kromě toho je senzitivita kometového testu srovnatelná nebo vyšší než ostatní testy pro zlomy vláken DNA.

Používání kometového testu pro genotoxické studie se od svého zavedení v roce 1988 stále zvyšuje. Speciální výhoda kometového testu tkví v tom, že může být použit jak *in vitro*, tak *ex vivo*. Druhé využití je obzvláště přínosné, neboť může být vyšetřena genotoxicita v různých cílových orgánech. K činitelům, které přímo poškozují DNA, mohou být pomocí kometového testu detegovány navíc další leze jako DNA-DNA a DNA-protein krosslinky.

Základní nevýhodou používání kometového testu pro testování genotoxicity je nedostatek důkladné validace. Každá laboratoř, která používá tento test si musí vytvořit vlastní set experimentálních podmínek a skórovacích kritérií. Efekty jednotlivých faktorů v protokolu (druh buněk, podmínky lyze a elektroforézy, jednotlivé časy) na celkový výsledek testu nejsou dokonale známy. Také je nutné, aby se vyjasnily detailní podmínky průběhu pokusu takovým způsobem, aby výsledky byly reprodukovatelné a srovnatelné mezi laboratořemi.

Výsledky z kometového testu musí být opatrně interpretovány jak s ohledem

k charakteru zlomů DNA, tak ve vztahu tohoto poškození k mutagenезi. Jednovláknový zlom vzniká dočasně v průběhu excizní opravy, tudíž se dá předpokládat, že vysoká úroveň zlomů v kometovém testu znamená buď velké poškození, nebo efektivní proces opravy.

Na druhou stranu byl kometový test modifikován tak, aby mohl zviditelnit proces opravy DNA, který odhaluje leze DNA, které by ušly pozornosti v tradičním kometovém testu. Exogenní leze-specifické opravné enzymy byly použity k odhalení apurinických oblastí, které se tvoří po alkylačním poškození. Stejně tak byly přidávány inhibitory opravy k zabránění ligace DNA po excizi.

Při interpretaci výsledků kometového testu je nutné zohlednit efekt cytotoxicity či apoptózy na test. Zlomy DNA se vyskytují i v nekrotických a apoptotických buňkách. Je proto důležité rozlišovat mezi přímou genotoxicitou a sekundárním poškozením DNA cytotoxicitou či apoptózou.

2.3.2 Základní postupy

Postup na kometový test se postupně vyvíjel od metody SCDA přes neutrální k alkalické verzi. V současné době jsou popisovány nejrůznější modifikace sahající od použití různých enzymů konvertujících různé poškození DNA na zlomy, až po použití k barvení DNA sloučeninami stříbra, aby k hodnocení nebyl nutný fluorescenční mikroskop. Poměrně novou modifikací je sledování reparačních schopností buňky a úprava k použití pro spermie, u kterých je DNA organizována naprosto odlišně od ostatních eukaryontních buněk (Anderson et al, 1998).

2.3.2.1 Alkalická verze

Tato procedura obsahuje elektroforézu jednotlivých buněk po lyze v alkalických podmínkách pro detekci jednovláknových zlomů. Po elektroforéze jsou buňky obarveny fluorescenční barvou a vyšetřovány pod mikroskopem. Objevení typického tvaru DNA komety je důkazem buněčného poškození. Tento postup (Sutherland et al, 1999) je adaptován z původně popsaného postupu dle Singha (1988).

Materiál:

vyšetřované buňky

PBS pH 7,4

normal-melting-point agaróza (NMP)

low-melting-point agaróza (LMP)

alkalický lyzující roztok

alkalický pufr na elektroforézu

400mM Tris-Cl, pH 7,4

ethidium bromid či jiná fluorescenční barva (PI, DAPI, YOYO, SYBR)

Přístroje/pomůcky:

vyhřívaná plotýnka

inkubátor pro eppendorfky

podložní a krycí skla

barvicí zařízení

set na horizontální elektroforézu

fluorescenční mikroskop

software pro analýzu obrazu

Vlastní postup:

1. příprava buněk na roztok 1 mil/ml v PBS
2. na předeřátá podložní skla (na vyhřívané ploténce 45 °C) napipetovat předeřátou NMP agarózu (v eppendorfce v inkubátoru 100 °C) opatrně přikrýt sklem, vychladit na ledu
volitelně: podložní skla mohou být pokryta vrstvou NMP agarózy a usušena předchozí den
3. napipetovat buněčnou suspenzi s LMP agarózou při 38 °C, předtím rozpuštěnou, vychladit na ledu
4. překrýt vrstvou LMP agarózy, vychladit na ledu
5. umístit do barvicího zařízení naplněného alkalickým lyzujícím roztokem, inkubovat 1 hod
6. umístit do barvicího zařízení naplněného alkalickým pufrem, inkubovat 20 min
7. umístit do vany na elektroforézu, zapnout na 60 min
8. umístit do barvicího zařízení naplněného 400 mM Tris-Cl na 30 min
9. vyměnit roztok Tris-Cl, ponechat 15 min, ještě jednou opakovat
10. obarvit ethidium bromidem
11. sledování pod fluorescenčním mikroskopem
12. hodnocení pomocí programu (nejpoužívanějším parametrem je % intenzity v ocase)

2.3.2.2 Neutrální verze

Neutrální podmínky při elektroforéze umožňují detekci pouze dvouvláknových zlomů. Podle některých autorů je tato metoda specifitější pro poruchy plodnosti, neboť reparační mechanismus oocyty zřejmě dokáže opravit jednovláknové zlomy a alkalilabilní úseky (Lewis et al, 2008).

Dodatečný materiál:

neutrální lyzující roztok (pH 8,3)

roztok RNázy A v lyzujícím roztoku

roztok proteinázy K v lyzujícím roztoku

neutrální pufr pro elektroforézu

300 mM NaOH

Dodatečný postup:

6. po lyzujícím roztoku umístit do roztoku RNázy A na 2 hod
7. přes noc nechat v roztoku proteinázy K
8. omýt neutrálním pufrem pro elektroforézu
9. elektroforéza viz alkalická verze
10. omýt 300 mM NaOH pro odstranění zbývajících RNA
11. neutralizace NaOH, dále viz alkalická verze krok 10.

2.3.3 Alternativní postupy

Kometový test se za účelem studování nejrůznějších typů poškození DNA dočkal mnoha modifikací. Cílem každé modifikace je převést studované poškození na zlom DNA, který je kometovým testem velmi specificky detegovatelný. K tomu se používají nejrůznější opravné enzymy, které způsobují excizní opravu DNA. Takto ošetřený soubor buněk se poté srovnává s neošetřeným a rozdíl v poškození ukazuje na sledovaný typ poškození. Endonukleáza III konvertuje oxidizované pyrimidiny na zlomy, formamidopyrimidin-DNA-glykosyláza konvertuje puriny (převážně guanin) na zlomy. AlkA konvertuje alkylované báze na apurinické/apyrimidinické oblasti. T4 endonukleáza V konvertuje cyklobutanové pyrimidinové dimery na zlomy. Dále se zvažuje použití UvrABC a jiných enzymů (internet 1).

Dále se tento test začíná používat v kombinaci s dalšími již zavedenými metodami, jako například Comet-FISH. Comet Fish je kombinace Comet Assay s fluorescenční in situ hybridizací, kdy se používá označených sond specifických DNA sekvencí a porušených DNA. Porušená i opravená DNA může být tak studována s mnohem větším rozlišením. V současné době jsou výsledky kombinace Comet Assay a FISH velice informativní. K odstraňování problémů dochází pozvolna s vývojem nových sond. Zatím neexistuje jednotná shoda na způsobu vzniku komet a tudíž není této problematice zatím zcela porozuměno (Shaposhnikov *et al.*, 2009). Dále se hledá jeho přímé klinické využití ve sledování radio/chemosenzitivity nádorů.

2.3.4 Modifikace na spermie

Pro použití kometového testu na spermie je nutné postup poměrně výrazným způsobem pozměnit. Nejen, že jsou spermie haploidní buňky, takže komety mají úplně odlišný tvar, navíc obsahují místo histonů protaminy. Proto je třeba u celé metody změnit nastavení délky expozice a doplnit/nahradit krok, ve kterém dojde k rozvolnění vazby DNA-protamin.

2.3.4.1 Postup podle Schmida

Oproti standardnímu postupu na alkalický kometový test zvyšuje Schmid 1 hodinu pobytu v lyzujícím roztoku na výsledné 2 hodiny (Schmid et al, 2006). Poté následuje krok převzatý z postupu na FISH na spermie, 30 min v 10 mM DTT (dithiothreitol) pro odstranění protaminů. Další postup není jasný, v jedné publikaci autor uvádí krok inkubace v alkalickém pufru, ovšem bez její doby, v jiném článku následuje rovnou elektroforéza. Modifikaci postupu zakončuje elektroforéza 20 min při 24 V (údaj ve V/cm autor neuvádí).

2.3.4.2 Postup podle Lewisové

Oproti postupu dle Smida zůstává krok s lyzujícím roztokem u tohoto postupu stejný, krok s DTT je obdobný předchozímu postupu, ale po něm následuje expozice v LIS (lithium diiodosalicylát), na 90 min při pokojové teplotě, která má rozvolnit disulfidické můstky. Krok s elektroforézou autorka článku již nepopisuje (Lewis et al, 2008).

2.3.4.3 Výsledný postup

Tento postup vznikl kombinací postupů dle Smida a standardního postupu používaného na AVČR (Akademie věd České republiky) s několika vlastními modifikacemi. Postup podle Smida byl zvolen z důvodu kratší doby a finančních úspor na LIS. Oba postupy totiž dávaly statisticky shodné výsledky.

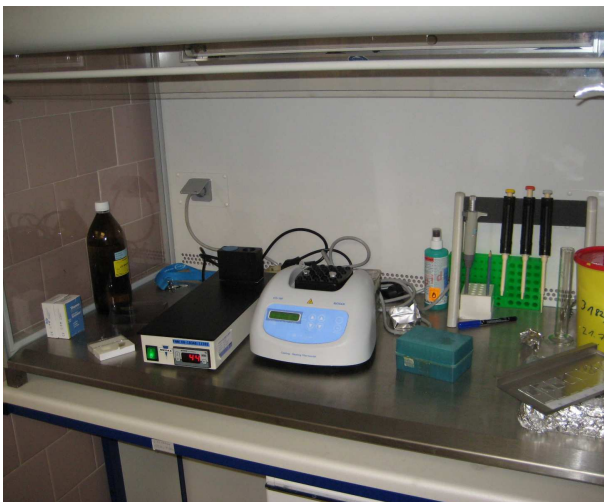
1-5 viz postup alkalické verze

6. do kyvety připipetovat DTT v cílové koncentraci 10mM, inkubovat 20 min

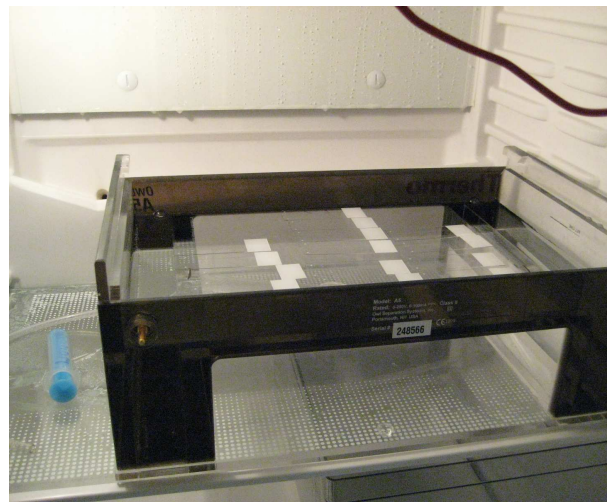
7. umístit do kyvety naplněné alkalickým pufrům, inkubovat 20 min

8. umístit do vany na elektroforézu, nastavit 1V/cm 300mA, spustit na 20 min

Další kroky opět viz postup alkalické verze



Obrázek 1 – Chlazení první vrstvy na ledu (vpravo)



Obrázek 2 – Elektroforetická vana v lednici

3 Praktická část

Cílem praktické části bylo zavedení metody Comet Assay na našem pracovišti a jeho zahrnutí do rutiny pracoviště. Jednalo se především o vytvoření modifikace metody pro vyšetření poškození DNA ve spermiích, ale vzhledem k univerzálnosti CA je možno zvažovat i další alternativy.

3.1 Spermioqram

Diagnostická metoda kompletního kvalitativního a kvantitativního vyšetření mužského ejakulátu je základním vyšetřením. Jedná se makro- a mikroskopické analýzu ejakulátu a hodnotí se celá řada parametrů.

3.1.1 Pracovní postup

Po přijmutí vzorku, vzorek vložíme do termostatu nastaveného na 37°C asi na 20 – 30 minut, kde dojde k jeho zkapalnění.

3.1.1.1 Makroskopická analýza

vzhled – hodnotíme barvu ejakulátu, normální vzorek je homogenní, šedě opaleskující

objem – změříme pomocí plastové 5 ml pipety, na jejíž stupnici odečteme zjištěný objem

viskozita – určíme délku tvořícího se vlákna při odkapávání nasátého vzorku (normální viskozita = vlákno kratší než 2 cm)

pH – kapku spermatu kápneme pomocí automatické pipety na indikační papírek, dle zbarvení žlutého pole určíme pH vzorku

3.1.1.2 Mikroskopická analýza

koncentrace spermií a hodnocení motility – automatickou pipetou kápneme 5 μ l ejakulátu doprostřed Maklerovy počítací komůrky a pozorujeme ve světelném mikroskopu při 400-násobném zvětšení; určíme celkový počet spermií na mřížce a spermie rozřadíme podle jejich pohyblivosti do následujících tříd: A + B rychlé a pomalé spermie s progresivní pohyblivostí, C spermie s pohybem na místě, D nepohyblivé spermie; mřížka je rozdělena na 10 x 10 stejných čtvercových políček, jednotlivé třídy spermií počítáme v 10 políčkách, což odpovídá počtu milionů spermií na 1 ml ejakulátu; při nízké koncentraci spermií, počítáme jednotlivé třídy v celé mřížce a výsledek celkového počtu i počtu v jednotlivých třídách vydělíme 10; zastoupení spermií v jednotlivých třídách určujeme v %; Zároveň hodnotíme

příměs ostatních přídatných elementů (kulaté buňky, buněčná drť, epitelie, bakterie). Při podezření na přítomnost leukocytů provedeme speciální barvení pomocí Leucoscreen

aglutinace – hodnotíme adhezenci pohyblivých spermií k sobě navzájem

vitalita spermií – pomocí automatické pipety na podložním skle smísíme kapku nativního ejakulátu a kapku práškového eosinu rozpuštěného v destilované vodě v poměru 1:1, překryjeme krycím sklíčkem; hodnotíme pod mikroskopem červeně obarvené spermie celkem na 100 spermií (mrtvé spermie mají narušenou membránu zkrze kterou eosin může pronikat); vyjádříme v %

spermMar Test – pomocí antispermatických protilátek hodnotíme přítomnost specifického antigenu na buněčné membráně spermií; na podložním skle smísíme kapku nativního ejakulátu s kapkou latexových partikulí s navázanými lidskými IgA v poměru 1:1, a na dalším sklíčku s IgG imunoglobuliny; hodnotíme po 2-3 minutách 100 pohyblivých spermií při zvětšení 400x a určíme kolik z nich má navázány latexové partikule; vyjádříme v %

koncentrace – podle odhadnuté koncentrace spermií v Maklerově komůrce naředíme spermie předem připraveným WHO pufrem (NaHCO_3 , 35% formalín, destilovaná H_2O), dojde k znehybnění spermií; 10 μl takto připravené suspenze spermií kápneme na obě mřížky Neubauerova hemocytometru, po 2 minutách spermie klesnou na dno počítacích mřížek; počítáme spermie v každé mřížce ve všech 25 velkých čtvercích; koncentraci vypočteme podle vzorce:

$$\text{koncentrace} = \frac{\text{součet obou mřížek}}{2} \times \text{koeficient ředění}$$

morfologie - hodnotíme na fixovaném a obarveném preparátu. Zbylé množství ejakulátu přeneseme do zkumavky, doplníme PBS pufrem do 12 ml a centrifugujeme 10 min při 1000 ot./min (provedeme 2x) Po centrifugaci odsajeme supernatant a naředíme sediment pomocí PBS dle vzorce:

$$\text{výsledný objem po naředění [ml]} = \frac{\text{koncentrace [mil/ml]} \times \text{objem [ml]}}{100}$$

15 μl suspenze kápneme na sklíčko, provedeme nátěr, necháme zaschnout a barvíme pomocí kitu Dip-Quick; hodnocení provedeme pomocí počítačového systému Hobson Sperm Tracker Morfology (stanovení frekvence normálních a abnormálních spermií s rozdělením do tříd podle nalezené abnormality)

probatorní preparace – do plastové konické zkumavky stříkačkou opatřenou jehlou vstříkneme 1 ml 40% kitu SpermGradient, pod něj opatrně podvrstvíme, opět stříkačkou

s jehlou, 1 ml 80% kitu SpermGradient; na gradient navrstvíme pipetou 1 ml ejakulátu a provedeme centrifugaci 13 min při 1100 ot./min; po centrifugaci odsajeme supernatant a sediment (obsahuje kvalitní spermie) resuspendujeme v 1 ml flushing média; 5 µl suspenze kápneme do Maklerovy komůrky a hodnotíme stejně jako nativní vzorek

Část vzorku po probatorní preparaci a část suspenze připravené na morfologické hodnocení spermií použijeme na novou metodu CometAssay

3.2 Modifikace Comet Assay pro použití na spermie

Vzhledem k tomu, že v ČR metodu CA na spermie zatím nikdo nevyužívá, bylo rozhodnuto využít dlouholetých zkušeností RNDr. B. Novotné, CSc., z ÚEM (Ústav experimentální medicíny) AVČR. Na tomto ústavu mají s tímto testem mnohaleté zkušenosti nejen v environmentálních studiích (Novotná *et al*, 2007), ale i s haploidními buňkami (Novotná *et al*, 2009).

3.2.1 První experimenty

K vyšetření byly použity lymfocyty z čerstvé periferní krve 27-letého zdravého muže. Z časových důvodů a vzhledem k faktu, že se jednalo pouze o demonstraci, byla doba unwindingu zkrácena na 20 minut. Zřejmě z tohoto důvodu vyšlo DiT (DNA in Tail, medián poměru kumulované intenzity fluorescence v ocase) pouze 0,03%, metoda je nastavena na 10% DiT pro zdravé kontroly.

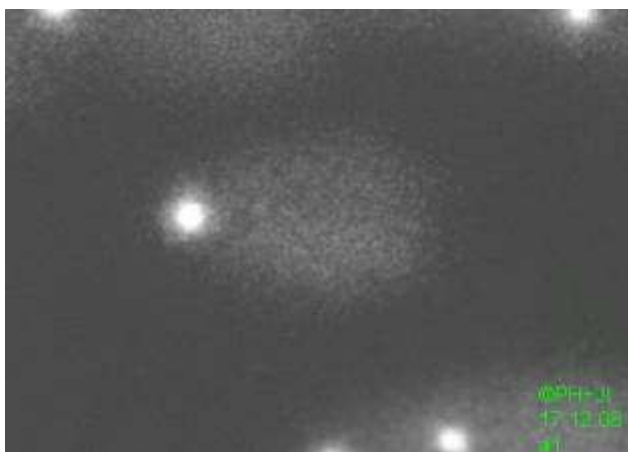


Obrázek 3 - poškození kolem 10% DiT

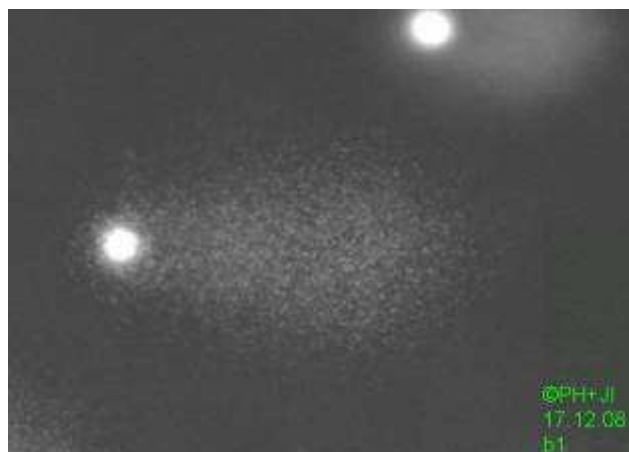
3.2.2 Modifikace pro spermie

Při hledání modifikací k použití kometového testu pro spermie byly využity čerstvé spermie téhož dárce. Srovnávány byly dva postupy, dle Smida a dle Lewisové (viz teoretická část). Při použití postupu dle Schmida vyšlo DiT 15%, po postupu dle Lewisové vyšlo DiT 17%. Vzhledem k tomu, že oba výsledky jsou statisticky srovnatelné, byl pro další pokusy

zvolen jednodušší a levnější postup dle Schmid. Tento postup jsme se rozhodli detailněji prozkoumat, zjistit vliv různých modifikací a využít jej ke zkoumání vlivu transportu a mražení na kvalitu DNA spermií. Na přiloženém obrázku jsou vidět dva nejdůležitější rozdíly oproti kometě vytvořené z lymfocytu: malé kompaktní jádro a velikost ocasu. Jádro je menší proto, že se jedná o haploidní buňku a DNA je mnohem kompaktněji uskláděna, ale také proto, že po spermatické buňce zůstane v agaru menší prostor pro rozvinutí nukleoidu. Velikost ocasu zřejmě ovlivňuje přidané kroky s DTT/LIS.



Obrázek 4 - metoda sec. Schmid



Obrázek 5 - metoda sec. Lewisová

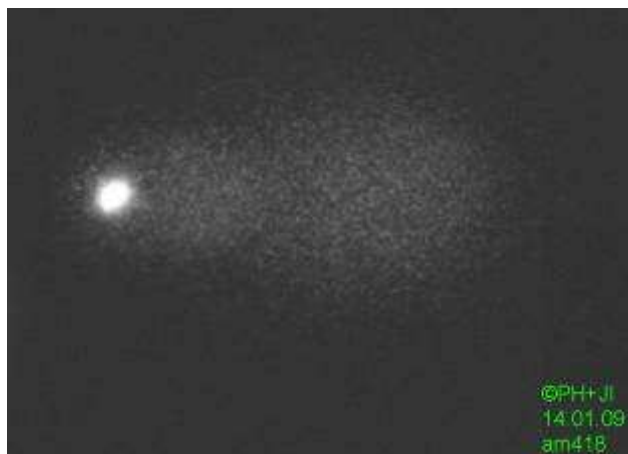
3.2.3 Zkoumání vlivu modifikací

3.2.3.1 Prodloužení unwindingu

Nejprve jsme zkoumali vliv unwindingu na celkovou velikost ocasu komety a na DiT%. Zároveň jsme srovnávali výsledky metody při jejím použití na čerstvých a zmražených spermiích. Také jsme upravili dobu pobytu v lyzujícím roztoku ze 2 hodin na 1 hodinu, neboť z dlouhodobých zkušeností plyne, že je tato doba dostatečná. Jako první jsme zkoumali rozdíl ve výsledcích při změně doby unwindingu ze 40ti minut na 30 minut. Tato změna se projevila statisticky nevýznamnými rozdíly ve výsledcích (rozdíl přibližně 1% DiT). Mnohem výraznější rozdíl jsme ovšem zaznamenali při srovnávání čerstvých a mražených spermií. Standardní postup vyšel u čerstvých spermií 32% DiT, u mražených 18% DiT. Zde je nutno podotknout, že docházelo k transportu obou vzorků, který probíhal za nestandardních podmínek. Proto jsme vypracovali postup pro standardní transport vzorků. Vzhledem k tomu, že byly k vyšetření použity ty samé spermie, lze odhadovat obrovský vliv transportu na spermie – zřejmě se jedná o kolísání teploty. V tomto pokusu byly čerstvé spermie transportovány 2,5 hodiny, v předchozím 1 hodinu.



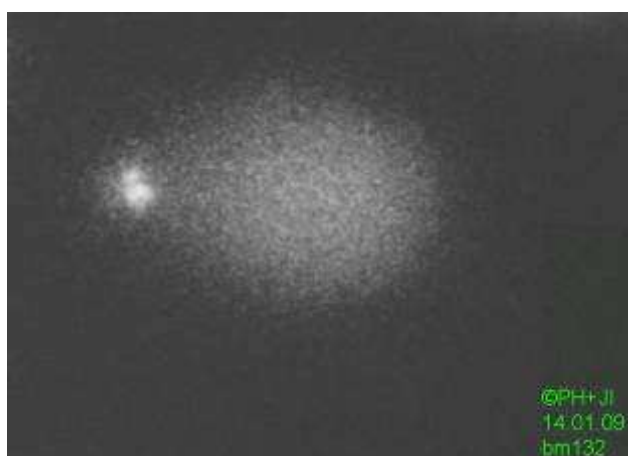
Obrázek 6 - poškození 4%



Obrázek 7 - poškození 14%



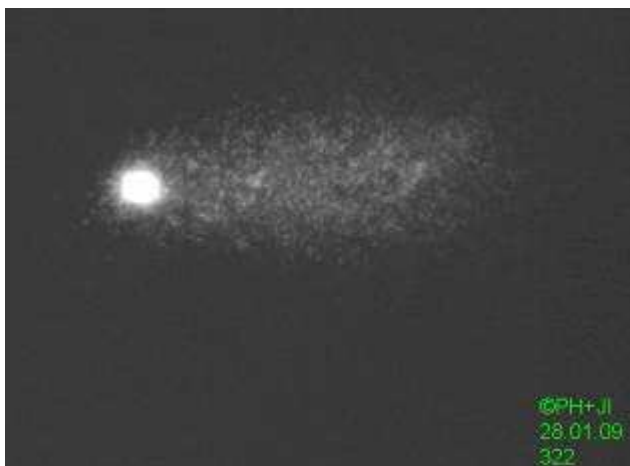
Obrázek 8 - poškození 28%



Obrázek 9 - poškození 81%

3.2.3.2 Vynechání unwindingu

Dále jsme zkoumali výsledky pokud je krok s unwindingem úplně vynechán. K těmto pokusům jsme stále používali jak mražené, tak čerstvé vzorky poskytnuté stejným dárce pro zajištění srovnatelnosti výsledků. U čerstvých spermií jsme při vynechání unwindingu nezaznamenali žádný podstatný rozdíl (30 vs 29 DiT%), ale u mražených spermií došlo k výraznému rozdílu (8 vs 4 DiT%). Tento rozdíl v reakci se nám nepodařilo vysvětlit, proto jsme se rozhodli vyzkoušet stejný postup na více vzorcích. Souběžně s tímto pokusem jsme již zkoušeli některá média připravit na našem pracovišti. Výsledky ovšem naprosto neodpovídaly výsledkům obdržným při použití standardních médií z AVČR. Kromě toho byl charakter ocasů velmi rozdílný od standardního a skla potažená agarem nedržela další vrstvy. Pro ilustraci opět jeden obrázek s agarem z našeho pracoviště.



Obrázek 10 - jedna z prvních komet s médii z CRG

3.2.3.3 Ověření postupu na více vzorcích

Následně bylo potřeba ověřit použitelnost takto modifikovaného postupu na více vzorcích. Z provozně-technických důvodů jsme upustili od transportu čerstvých vzorků, proto byly v tomto pokusu používány pouze mražené vzorky. Pro srovnání byl opět použit mražený vzorek od dárce (dále jen IS – interní standard) a 2 vzorky od pacientů našeho pracoviště. Také bylo opět nutno vyzkoušet nová média vytvořená na našem pracovišti. Pokus o transport připravených skel s hotovou trojvrstvou agarózy nevyšel. Jak na zaschlých, tak i na sklech transportovaných v humidboxu se nevyvinuly žádné komety. Byla patrná pouze jádra („lentilky“).

Tento pokus měl velmi nečekané výsledky, postup bez unwindingu vykazoval DiT% zhruba dvojnásobný oproti postupu s unwindingem. Nejpravděpodobnějším vysvětlením je záměna postupů s a bez unwindingu, či jiná chyba v postupu. V průběhu tohoto pokusu byl ovšem zachycen jiný problém. U mražených spermií dochází k velmi silnému barvení bičíku, který může výrazným způsobem ovlivňovat výsledky. Tento problém prozatím zůstává nedořešen.

3.2.3.4 Zkrácení doby unwindingu

Sedmý pokus byl obdobou pokusu třetího, pouze s větším množstvím mražených vzorků. Vzhledem k tomu, že byly hodnoty DiT% stále příliš vysoké, bylo rozhodnuto vyzkoušet snížení doby unwindingu z 30ti na 20 minut. K očekávanému snížení hodnot DiT% sice došlo, ale vzhledem k jiným problémům v průběhu pokusu bylo rozhodnuto tento pokus vůbec nezahrnovat do modifikací.

3.2.4 Hledání postupu pro pipetaci

Vzhledem k plánovanému hledání korelačních vztahů mezi úspěšností IVF/ICSI a CA

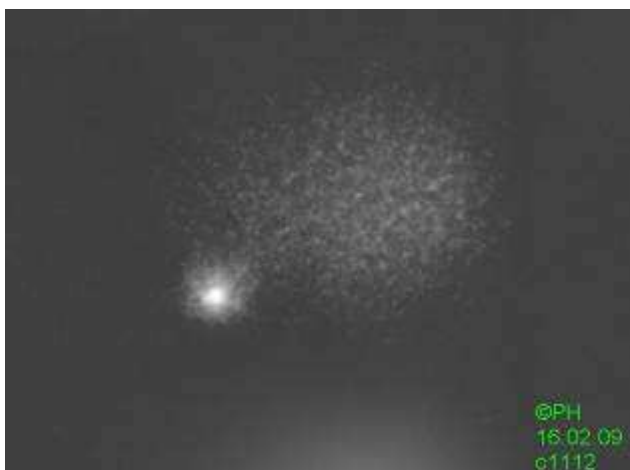
bylo třeba vyzkoušet různé postupy pipetace spermií přímo na agarovou vrstvu či jiný obdobný postup.

3.2.4.1 Vyzkoušení komerčních skel

Jako první jsme vyzkoušeli zakoupená skla společnosti Trevigen, která již mají první vrstvu agarózy na sobě, takže se může suspenze spermií v agaróze pipetovat přímo na sklo. V tomto pokusu jsme pro zajištění standardnosti postupu používali zmražené lymfocyty z AVČR. Komerční skla se ovšem neosvědčila, neboť na nich druhá vrstva vůbec nedržela, takže nebylo možné pokračovat v postupu.

3.2.4.2 Ověření použitelnosti komerčních skel

Opětovné vyzkoušení skel z Trevigenu. Výsledek byl obdobným jako při pokusu 4 (p4), agaróza sice na skle zůstala, ale komety byly nehodnotitelné, neboť ocasy nesměřovaly stejným směrem. Poté bylo vyzkoušeno pipetování do teplé kapky agaru. Tento pokus vyšel poměrně uspokojivě, viz obrázek z Trevigenového skla.



Obrázek 11 - sklo Trevigen

3.2.5 Pokusy o přípravu médií na CRG

V dalším pokusu byl kladen důraz na vyzkoušení různých kombinací médií připravených na našem pracovišti a standardních médií z AVČR. Výsledky byly celkem uspokojivé, takže bylo rozhodnuto přistoupit k zavedení kometového testu na naše pracoviště i přesto, že byly rozdíly v jednotlivých sklech poměrně velké (každé měření prováděno na dvou nezávislých sklech k vyloučení biasu) a výsledky neodpovídaly výsledkům na AVČR. Tyto problémy bude vhodnější řešit již na našem pracovišti.

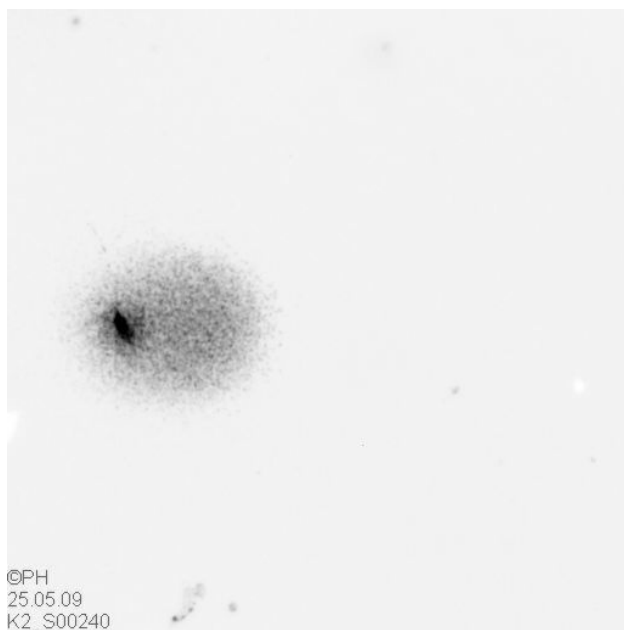
3.2.6 Zavedení Comet Assay na CRG

Po vyřešení softwarového vybavení a ověření médií připravovaných na CRG bylo

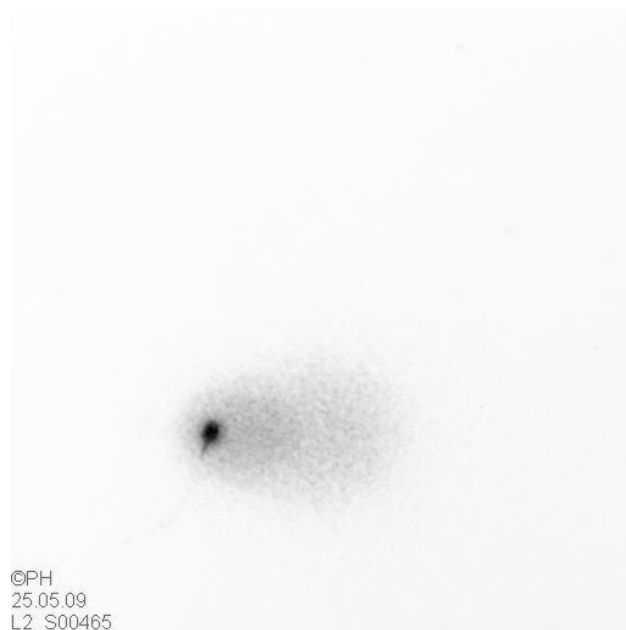
přistoupeno k postupnému zavádění CA na našem pracovišti. Cílem tohoto pokusu bylo nejprve ověření funkčnosti přístrojů, několik technologických úprav postupu a vyzkoušení některých chemikálií, které nebyly dostupné v předchozím pokusu. Většina technických překážek byla postupně vyřešena, problém s barvením preparátů ovšem stále přetrvává. Přijato dočasné řešení barvení preparátů na jiném oddělení našeho ústavu (Centrum cystické fibrózy) s tím, že postupu barvení bude věnována pozornost až po optimalizování a standardizaci metody.

3.2.7 Optimalizování

V rámci optimalizování metody bylo potřeba dořešit velkou oscilaci zdroje pro elektroforézu, zahrnutí vodní lázně pro standardní rozmrazování vzorků a koordinaci s vyšetřením spermioqramu u čerstvě odebraných vzorků. Hodnoty DiT% vycházely stále extrémně velké (přes 60%) u většiny vzorků, přesto bylo rozhodnuto provést pokus o standardizaci metody a finální modifikace postupu činit až poté. Díky problémům s barvením v laboratoři cystické fibrózy bylo rozhodnuto o zakoupení vlastních barviček.



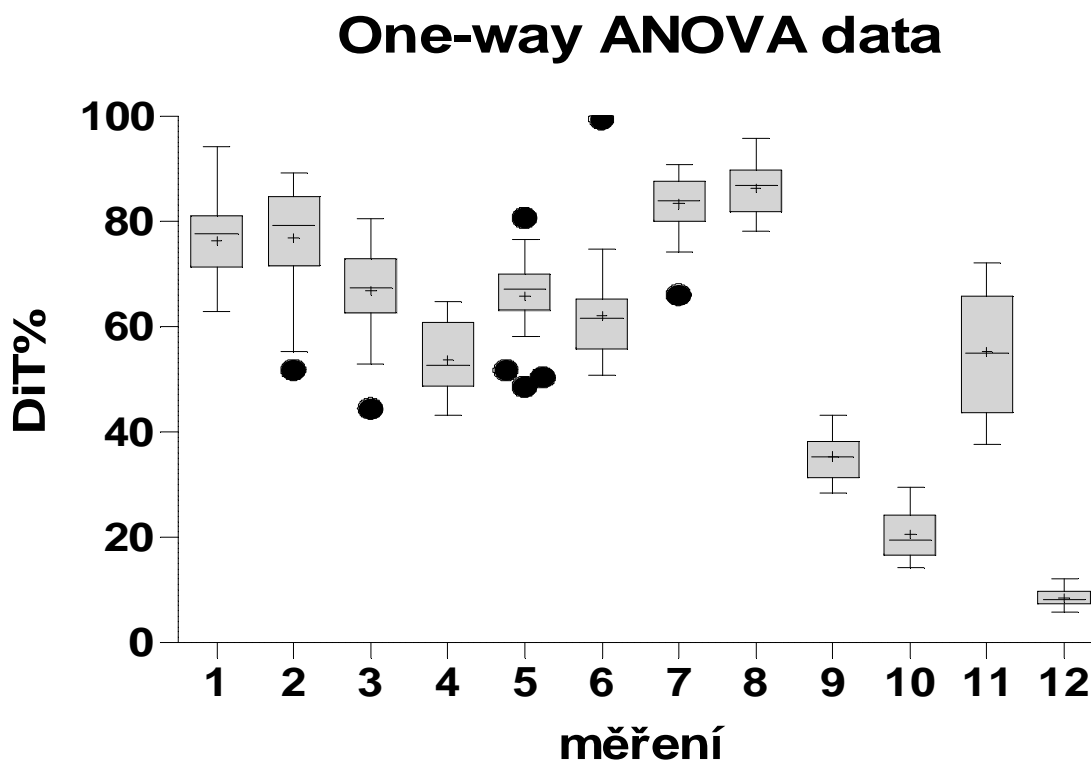
Obrázek 12 - jedna z prvních komet na CRG



Obrázek 13 - jedna z prvních komet na CRG

3.2.8 Standardizace

Cílem tohoto pokusu bylo standardizovat průběh CA tak, aby byla data srovnatelná nikoliv pouze v rámci měření ale i mezi jednotlivými pokusy. Byl proto 6x zopakován tentýž pokus se stejnými zmraženými vzorky, pokaždé v duplicitním provedení. Na těchto datech byla provedena statistická analýza (viz příložený graf), která vylučuje srovnatelnost jednotlivých částí, pokus tedy skončil neúspěchem.

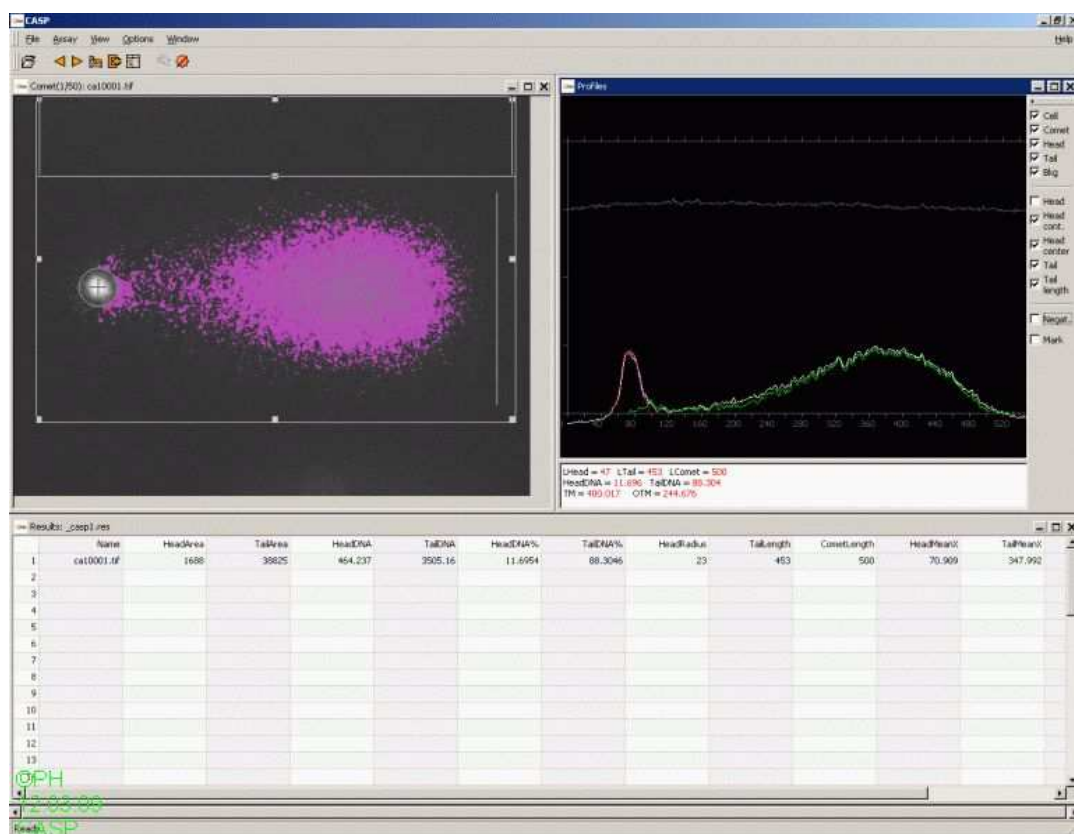


Graf 1 - ANOVA analýza standardizačního pokusu

3.3 Software

Vzhledem k nutnosti pořízení počítačového programu na analýzu obrazu specifického pro kometový test bylo potřeba postupně vyzkoušet jednotlivé programy určené k tomuto účelu. Tuto část prováděl kolega, proto se jí věnuji pouze okrajově. Základním rozhodnutím, před kterým stojí každá laboratoř zvažující zakoupení obdobného programu, je, zda použít program s integrací, či bez integrace. Programy s integrací jsou pouze komerční, tudíž poměrně drahé, a je u nich potřeba pracovat na počítači přímo připojeném k mikroskopu či jinému zařízení, na kterém dochází k zachytávání obrazových dat, následně integrovaných do počítače. S programy bez integrace se dá pracovat na jakémkoli počítači, ve kterém jsou uložena obrazová data, jež byla zachycena na přístroji libovolným způsobem. Takovýchto programů je na internetu volně ke stažení velké množství.

Po podrobném prozkoumání byl v každé skupině vybrán nejvhodnější zástupce, jehož v současné době kolega detailně testuje.



Obrázek 14 - Screenshot programu CASP

4 Závěr

Přes veškerou snahu se nepodařilo metodu CA pro spermie zavést do naší laboratoře před dokončením a odevzdáním této práce. Po neúspěchu o standardizaci metody bylo rozhodnuto o detailním prozkoumání možných příčin, které zabralo více než 2 měsíce. Nakonec jsme se rozhodli přejít zpět k jednoduššímu a již zavedenému postupu pro leukocyty a jeho důkladnému prozkoumání na půdě AVČR, kde funguje bez problémů.

4.1 Současný stav

V současné době dokončujeme přenos fungující CA pro leukocyty na naše pracoviště. Metoda poskytuje již téměř srovnatelné výsledky při provedení na našem pracovišti a na AVČR. Zároveň při ověřování této metody postupují práce při hledání příčin problémů u metody pro spermie.

4.2 Další plány

Ihned po nalezení a odstranění problémů při CA pro spermie bude následovat zprovoznění této metody na našem pracovišti. Poté bude možné začít hledat korelace vyšetření pomocí CA a ostatních metod na vyšetření fragility DNA. Také plánujeme hledat vliv fragilní DNA ve spermiích na výsledky jednotlivých metod umělého oplození u různých skupin pacientů. Navíc se jedná o spolehlivou metodu zjišťující poškození DNA způsobené různými laboratorními postupy, což následně umožní tyto postupy zdokonalovat.

4.3 Přínosy zavedení Comet Assay

Při studiu podkladů a provádění prvních pokusů vedoucích ke zjištění fragility DNA u spermií jsem se detailně seznámila s teoretickým i praktickým pozadím metody CA. V rámci své bakalářské práce jsem se společně s kolegy, Centra asistované reprodukce, pokoušela metodu standardizovat a připravit pro použití v praxi. Postupné odstraňování jednotlivých problémů, stojících v cestě úspěšnému zavedení této metody do klinické praxe na našem pracovišti, však výrazně převyšuje časové možnosti této práce. Na zavedení této metody dále pracujeme. Pro naše pracoviště je CA dlouho očekávaným rozšířením diagnostických možností, které umožní zkoumání několika dalších příčin neplodnosti u mužů. Jedná se totiž o jeden z posledních dosud chybějících článků vyšetření neplodnosti na našem ústavu. Doplní již zavedené či právě zaváděné metody jako základní spermioqram, vyšetření protilátek, chromozomálních aberací, aneuploidií, protaminace, molekulárních metod (AZF, CF) a metody průtokové cytometrie (SCSA, chromomycin, či únik apoptóze)

5 Literatura

- Ahmadi, A. (1999): Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology*, 284, 696-704.
- Anderson, D., Plewa, M. J. (1998): The International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*, 13, 67-73.
- Andrabi, S. M. H. (2008): Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA , fragmentation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24 (12), 561-569.
- Bannister, L.A., Schimenti, J.C. (2004): Homologous recombinational repair proteins in mouse meiosis. *Cytogenetical Genome Resources*, 107, 191-200.
- Bielenska, M., Tan, S. L., Ao, A. (2000): Fluorescence in situ hybridization of sex chromosomes in spermatazoa and spare preimplantation embryos of a Klinefelter 46, XY/47XXY male. *Human Reproduction*, 15, 440-444.
- Cho, C., Jung-Ha, H., Willis, W.D. (2003): Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biological reproduction*, 69, 211-217.
- Erenpreiss, J., Spano, M., Erenpreisa, J., Bungum, M., Giwereman, A. (2006): Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian Journal of Andrology*, 8 (1), 11-29.
- ESHRE, (1999): Manual on Basic Semen Analysis, *NAFA and ESHRE-SIGA*, Final version.
- Evenson, D.P., Jost, L.K., Marshall, D. (1999): Utility of the sperm chromatin assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction*, 14, 1039-1049.
- Genesca, A., Caballin, M.R., Miro, R., Benet, J., Germa, J.R., Egozcue, J. (1992): Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Human Genetics*, 89, 181-186.
- Guzick, D.S, Overstreet, J.W., Factor-Litvak, P. (2001): Sperm morphology, motility, and concentration in infertile and fertile men. *New England Journal of Medicine*, 345, 1388-1393)
- Irvine, D.S, Twigg, J.P, Gordon, E.L, Fulton, N., Milne, P.A., Aitken, R.J. (2000): DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of Andrology*, 21, 33-44.
- Kodama, H., Yamaguchi, R, Fukuda, J. (1997): Increased oxidative deoxy ribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertility and Sterility*, 68, 519-524.
- Krammer, P.H., Behrmann, I., Daniel, P., Dhein, J., Debatin, K.M. (1994): Regulation

of apoptosis in the immune system. *Current Opinion in Immunology*, 6, 279-289.

Kruger, T.F., Acosta, A.A., Simmons, K.F., Swanson, R.J., Matta, J.F, Oehninger, S. (1988): Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 49, 112-117.

Lewis, J.D., Song, Y., de Jong, M.E., Bagha, S.M., Ausio, J. (1999): A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Cromosoma*, 111, 473-482.

Lewis, S. E. M., Agbaje, I. M. (2008): Using the alkaline comet assay in prognostic tests for male infertility and assisted reproductive technology outcomes. *Mutagenesis*, 23, 163-170.

Macek, M., Vilímová, Š., Potužníková, P., Yurov, Y., Vorsanova, S., Diblík, J., Krejsová, A., Machátková, M., Koudová, M., Alánová, R., Paulasová, P., Brandejská, D., Uhrová, E., Kratěnová, A., Smetanová, I., Novotná, D., Chudoba, D., Kulovaný, E., Krutílková, V., Hromadníková, I., Mardešič, T., Macek, Jr. (2002): Využití lékařské genetiky v reprodukční medicíně. *Časopis lékařů českých*, 141(1), 28-34.

Matsuda, Y., Tobari, L. (1988): Chromosomal analysis in mouse eggs fertilized in vitro with sperm exposed to ultraviolet light (UV) and methyl and ethyl methanesulfate (MMS and EMS), *Mutation Research*, 198, 131-144.

Muriel, L., Segrelles, E., Goyanes, V., Gosálvez, J., Fernandez, J.L. (2004): Structure of human sperm DNA and background damage, analysed by in situ enzymatic treatment and digital image analysis. *Molecular and Human Reproduction*, 10, 203-209.

Novotna, B., Petr, J., Sedmikova, M., Kratochvilova, J., Jilek, F. (2009): Effect of different activation modes on DNA integrity of porcine M II oocytes matured in vitro. ahead of print

Zygote, 1-7.

Novotna, B., Topinka, J., Solansky, J., Chvatalova, I., Lnenickova, Z., Sram, R.J. (2007): Impact of air pollution and genotype variability on DNA damage in Prague policemen. *Toxicology letters*, 172(1-2), 37-47.

Ostling, O., Johanson, K.J. (1984): Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 10, 291-298.

Page, A.W., Orr-Weaver, T.L. (1997): Stopping and starting the meiotic cell cycle. *Current Opinion in Genetics and Development*, 7, 23-31.

Primakoff, P., Myles, D.G. (2002): Penetration: adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. *Science*, 296, 2183-2185.

Shamsi, M.B., Kumar, R., Dada, R. (2008): Evaluation of nuclear DNA damage in

human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian Journal Medical Research*, 127, 115-123.

Shamsi, M.B., Kumar, R., Dada, R. (2008): Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian Journal of Medical Research*, 127, 115-123.

Shaposhnikov, S., Frengen, E., Collins, A. R. (2009)“ Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization-a review. *Mutagenesis*, doi:10.1093/mutage/geb021, 1-7.

Schmid, T. E., Eskenazi, B. E., Baumgartner, A., Marchetti, F., Young, S., Weldon, R., Anderson, D., Wyrobek, A. J. (2007): The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Human Reproduction*, 22, 180-187.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. (1988): A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.

Spano, M., Bonde, J.P., Hjollund, H.I. (2000): Sperm chromatin damage impairs human fertility, *Fertility and Sterility*, 73, 43-50.

Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., Nagata, S. (1993): Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, 75, 1169-1178.

Sutherland, J. E., Costa, M. (1999): Current Protocols in Toxicology, John Wiley & sons, inc., New York.

Tarozzi, N., Bizzaro, D., Flamigni, C., Borini, A. (2007): Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reproductive Bio Medicine Online*, 14 (6), 746-757.

WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. (1999). Third edition. Cambridge university press.

Zini, A., Bielecki, R., Phang, D. (2001): Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*, 75, 674-677.

Zini, A., Libman, J. (2006): Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *Canadian Medical Association Journal*, 175 (5), 495-500.

Použité internetové stránky:

1. <http://www.cometassay.com>, (odkaz ze dne 19.4.2009)

Seznam zkratek

AOT	Acridin Orange Test
AVČR	Akademie věd České republiky
AZF	Faktor azoospermie
CA	Comet Assay
CASA	Computer Aided Sperm Analysis
CF	Cystická fibróza
CRG	Centrum reprodukční genetiky
DBD-FISH	DNA Breakage Detection-FISH
DFI	DNA fragmentation index
DiT	DNA in Tail
DTT	Dithiothreitol
ESHRE	European Society for Human Reproduction and Embryology.
FISH	Fluorescenční In Situ Hybridizace
HDS	Highly DNA stainable cells
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICSI	Intra Cytoplasmic Sperm Injection
IS	Interní standard
ISNT	In Situ Nick Translation
IVF	In vitro fertilizace
K-SDS	Sodium dodecyl sulfate
LIS	Lithium diiodosalicylát
LMP	Low-melting-point agaróza
NMP	Normal-melting-point agaróza
PBS	Phosphate Buffered Saline
SCDA	Sperm Chromatin Dispersion Assay
SCGE	Single Cell Gel Electrophoresis
SCSA	Sperm Chromatin Structure Assay
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-Nick-End-Labeling
UDS	Unscheduled DNA synthesis
ÚEM	Ústav experimentální medicíny
WHO	World Health Organization